动 物 学 研 究 2012，Oct. 33(5): 463−472 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.05463

鲫属鱼类 DNA 条码及种与亚种划分

程 磊[1,2], 常玉梅[1], 鲁翠云[1,2], 曹顶臣[1], 孙效文[1,*]

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 农业部淡水水产生物技术与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要：鲫属(*Carassius*)鱼类由于表型变异大, 分布范围广, 分类一直不完善。该属常被分为三个种：黑鲫(*C. carassius*)、白鲫(*C. cuvieri*)和鲫(*C. auratus*)。 鲫又可分为多个亚种(包括金鱼), 其中银鲫(*C. auratus gibelio*)亚种有时被视作一个独立的种。该文研究了线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I (*COI*)基因 5'端 651 bp 的片段在这些种和亚种（共计 128 尾标本）中的变异。结果表明，*C. carassius*、 *C. cuvieri* 和 *C. auratus* 均为有效种, 同时欧亚大陆的与日本列岛的 *C. auratus* 有明显分化；而 *C. auratus gibelio* 和 *C. auratus auratus* 有一些共享的单倍型, *C. auratus gibelio* 应被视为 *C. auratus* 的一个亚种, 而不是一个有效物种。由于 *C. auratus auratus* 和 *C. auratus gibelio* 等类群中同时存在二倍体和三倍体, 因此，倍性不宜作为种或亚种的划分标准。

关键词：鲫属; DNA 条码; *COI* 基因; 物种鉴定; 银鲫
中图分类号：Q349; Q959.468.09 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)05-0463-10

DNA barcoding and species and subspecies classification within genus *Carassius*

CHENG Lei[1,2], CHANG Yu-Mei[1], LU Cui-Yun[1], CAO Ding-Cheng[1], SUN Xiao-Wen[1,*]

(1. *Key Laboratory of Aquatic Freshwater Aquatic Biotechnology and Breeding*, *Ministry of Agriculture of China*, *Heilongjiang Fisheries Research Institute*, *Chinese Academy of Fishery Sciences*, *Harbin* 150070, *China*;
2. *College of Fisheries and Life Science*, *Shanghai Ocean University*, *Shanghai* 201306, *China*)

Abstract: The classification of *Carassius* has not been well established due to its great variability and wide distribution. Usually, *Carassius* is identified as three species: *C. carassius*, *C. cuvieri* and *C. auratus*, the latter including several subspecies, such as goldfish. Out of these subspecies, *C. auratus gibelio* have recently been thought of as a valid species of *Carassius.* In this study we collected the 5′end 651 bp segments of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase I (*COI*) gene from 128 specimens, including *C. carassius*, *C. cuvieri*, *C. auratus auratus*, *C. auratus gibelio* and *C. auratus langsdorfii*. All three species of *Carassius* (*C. carassius*, *C. cuvieri*, *C. auratus*) were found to be valid, meanwhile genetic differentiation between the Eurasian *C. auratus* and Japanese *C. auratus* has reached a high level. However, several haplotypes were shared between *C. auratus auratus* and *C. auratus gibelio*. Consequently, *C. auratus gibelio* should be regarded as a subspecies of *C. auratus* rather than a valid species. Moreover, because both diploids and triploids exist in *C. auratus auratus* and *C. auratus gibelio*, ploidy level should not be used as criteria for the classification of species or subspecies in *Carassius*.

Key words: *Carassius*; DNA barcode; *COI* gene; Species identification; *C. auratus gibelio*

鲫属(*Carassius*)鱼类广泛分布于欧亚大陆, 更是东亚地区淡水水体中的常见鱼类。鲫鱼是我国重要的淡水经济鱼类之一, 我国目前年产食用鲫鱼约 200 万吨(Gui, 2007)。从鲫鱼中选育出的金鱼(goldfish), 具有异常丰富的表型变异, 其驯化和变异的遗传基础是遗传学家关心的课题之一(Chen, 1959; Komiyama et al, 2009; Wang, 2007)。鲫(*C. auratus*)中不仅有两性生殖的二倍体, 也有行雌核

收稿日期：2012-01-05；接受日期：2012-08-23
基金项目：中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(201109)；农业部引进国际先进农业科学技术计划(“948”, 2011-G12)；国家重点基础研究发展计划(“973”, 290CB126305)；公益性行业(农业)科研专项(200903045)
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: sunxw2002@163.com
第一作者简介：程磊(1982 一), 男, 博士, E-mail: chenglei1982@126.com

发育生殖的三倍体和四倍体, 特别是这些雌核发育多倍体中有一定比例的可育雄性个体(Fan & Shen 1990; Gui & Zhou，2010; Xiao et al, 2011)。以上特性使得鲫成为研究脊椎动物性别决定机制和生殖方式调控机制的良好模型(Gui & Zhou，2010)。因此, 鲫属鱼类不仅具有重要的生态和经济价值, 其生物学特性也日益引起生物学家的关注。

我国鱼类学家认为中国大陆鲫属鱼类可以划分为鲫 (*C. auratus*)和黑鲫 (*C. carassius*)两种, 前者又可以分为鲫 (*C. auratus auratus*)指名亚种和银鲫 (*C. auratus gibelio*)亚种(Chen & Huang, 1982; Luo & Yue, 2000)。由于采样的局限性, 我国学者并未研究日本列岛及其周边的鲫鱼分类。日本学者则将日本的鲫鱼分为鲫 (*C. auratus*)与白鲫 (*C. cuvieri*)两种, 前者又被分为 5 个亚种：*C. auratus* subsp. 1、*C. auratus* subsp. 2、*C. auratus grandoculis*、*C. auratus buergeri* 和 *C. auratus. langsdorfii* (Hosoya, 2002)。白鲫 (*C. cuvieri*)早期被认为是鲫 (*C. auratus*)的一个亚种, 后来由于分子证据支持了其单系性, 被认定为一个独立的种(Murakami et al, 2001)。

由于鲫属鱼类的地理分布广, 表型变异大, 染色体倍性和生殖方式复杂, 其分类一直没有得到很好的解决(Ren et al, 2002; Takada et al, 2010)。例如, 由于中国和日本的雌核发育多倍体鲫鱼最初分别是在银鲫 (*C. auratus gibelio*) (Gui, 2007; Shen et al, 1997)和关东鲫 (*C. auratus langsdorfii*) (Kobayasi, 1971; Kobayasi et al, 1970)中发现的, 后来学者们习惯上将中国和日本的雌核发育多倍体鲫鱼分别视为银鲫(Gui, 2007; Shen et al, 1997)和关东鲫(Hosoya, 2002; Ohara et al, 1999, 2000)。但是近年的研究发现多倍体在遗传上可能更接近同域的二倍体而不是异域的多倍体(Apalikova et al, 2008; Brykov et al, 2002; Murakami et al, 2001; Takada et al, 2010), 将银鲫和关东鲫等同于多倍体的观点值得商榷；而且即使将银鲫和关东鲫等同于雌核发育多倍体, 中国多倍体与日本多倍体间的关系也有待厘正。又如，虽然日本的 *C. auratus* 鉴定作为 5 个亚种, 但是这些亚种似乎并不是单系群(monophyletic group) (Takada et al, 2010; Yamamoto et al, 2010)。我国学者倾向将银鲫视为鲫的一个亚种(Chen & Huang, 1982; Luo & Yue, 2000), 然而，近年来国外学者更多的是将其视为一个有效种(Halacka et al, 2003; Liousia et al, 2008; Öezuluğ et al, 2004)。鲫属鱼类, 特别是鲫(*C. auratus auratus*)指名亚种和银鲫(*C. auratus gibelio*)亚种的形态鉴别较为困难。本文取样时，严格按照《中国鲤科鱼类志》(Chen & Huang, 1982)、《中国动物志•硬骨鱼纲 •鲤形目 •下卷》)(Luo & Yue, 2000)的检索标准加以甄别。

加拿大 Guelph 大学的 Hebert 教授于 2003 年首次提出通过对一个标准基因的 DNA 序列分析, 作为一种新的物种鉴定手段，即 DNA 条形码(Hebert et al, 2003a)。许多研究已经证实了线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I(cytochrome *c* oxidase subunit I, *COI*)靠近 5′端的一段约 650 bp 序列作为 DNA 条码识别鱼类物种的有效性(Ward et al, 2005, 2008, 2009)。本研究通过对鲫属鱼类线粒体 *COI* 基因部分序列的对比分析, 研究了 *COI* 基因在鲫属鱼类种间及种内的序列变异, 据此探讨了鲫属鱼类种与亚种的划分。日本学者认为金鱼可能起源于中国的银鲫(*C. auratus gibelio*) (Komiyama et al, 2009)。银鲫(*C. auratus gibelio*)主要分布于长城以北, 我国鱼类遗传学者习惯上将其等同于雌核发育多倍体鲫鱼。金鱼是有性生殖二倍体, 历史文献记载应起源于南宋时期杭州一带(Chen, 1959；Wang, 2007)。因此, 金鱼起源于银鲫的观点值得商榷。本文采集了少量彩鲫样品, 结合公共数据库中金鱼、红鲫的资料(见“材料和方法”部分), 同时探讨了观赏鲫鱼的分类地位。

1 材料和方法

1.1 研究样品

本研究共用到 128 尾样品, 研究中用到的各个样品的采集时间、地点、倍性、序列的 GenBank 登录号和标本号整理见表 1。样品有如下 3 个来源：(1)本研究采集的中国大陆鲫属鱼类 *C. carassius* 、*C. auratus auratus*、*C. auratus gibelio* 等种与亚种, 共计 46 个体, 部分实验样品的倍性经流式细胞仪检测, 倍型检测参考 Geng & Sun (2008)的方法。每个个体取鳍条组织固定，保存在 95%的酒精中, 供提取基因组总 DNA 之用。(2) Barcode of Life Data (BOLD) 数据库中的能公开下载到的 76 条鲫属鱼类DNA条形码(截至2011年12月21日)。(3) BOLD 数据库中保存的 *C. cuvier* 和 *C. auratus langsdorfii* 等种与亚种序列较少。由于 *C. cuvier*、*C. auratus langsdorfii* 等种与亚种主要分布在国外, 不便采集样品。GenBank 中保存的能下载到的 *C. cuvier* (GenBank 登录号：AB045144、HQ536316~HQ536

表 1　本研究所用样本信息
Tab. 1　Detail specimen information

学名 Scientific name	标本 Specimen	倍性 Ploidy level	采集时间地点 Sampling time & locality	GenBank 登录号 GenBank Accession No.	单倍型 Haplotypes
C. carassius	XJJ24	N/A	2009 年 11 月新疆阿勒泰	JQ319108	H2
C. carassius	XJJ25	N/A	2009 年 11 月新疆阿勒泰	JQ319109	H2
C. carassius	XJJ26	N/A	2009 年 11 月新疆阿勒泰	JQ319110	H2
C. carassius	XJJ28	N/A	2009 年 11 月新疆阿勒泰	JQ319111	H2
C. auratus gibelio	FZ02	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319082	H8
C. auratus gibelio	FZ39	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319088	H8
C. auratus gibelio	FZ41	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319089	H8
C. auratus gibelio	FZ43	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319090	H8
C. auratus gibelio	FZ44	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319091	H8
C. auratus gibelio	FZ75	2n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319098	H8
C. auratus gibelio	FZ83	2n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319099	H8
C. auratus gibelio	FZ10	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319083	H10
C. auratus gibelio	FZ13	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319084	H10
C. auratus gibelio	FZ30	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319085	H10
C. auratus gibelio	FZ31	2n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319086	H10
C. auratus gibelio	FZ33	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319087	H10
C. auratus gibelio	FZ48	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319092	H10
C. auratus gibelio	FZ49	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319093	H10
C. auratus gibelio	FZ58	3n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319094	H10
C. auratus gibelio	FZ60	2n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319095	H10
C. auratus gibelio	FZ61	2n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319096	H10
C. auratus gibelio	FZ74	2n	2008 年 9 月黑龙江双凤水库	JQ319097	H10
C. auratus gibelio	XQY02	3n	2010 年 7 月黑龙江西泉眼水库	JQ319112	H10
C. auratus gibelio	XQY12	2n	2010 年 7 月黑龙江西泉眼水库	JQ319113	H16
C. auratus gibelio	XQY24	2n	2010 年 7 月黑龙江西泉眼水库	JQ319114	H10
C. auratus gibelio	XQY28	3n	2010 年 7 月黑龙江西泉眼水库	JQ319115	H10
C. auratus auratus	CJ16	2n	2010 年 10 月黑龙江水产研究所	JQ319079	H14
C. auratus auratus	CJ18	2n	2010 年 10 月黑龙江水产研究所	JQ319081	H14
C. auratus auratus	CJ17	2n	2010 年 10 月黑龙江水产研究所	JQ319080	H15
C. auratus auratus	BJ01	N/A	2010 年 10 月北京通州	JQ319070	H16
C. auratus auratus	BJ02	N/A	2010 年 10 月北京通州	JQ319071	H16
C. auratus auratus	BJ03	N/A	2010 年 10 月北京通州	JQ319072	H16
C. auratus auratus	BJX01	N/A	2011 年 4 月北京通州	JQ319073	H16
C. auratus auratus	BJX02	N/A	2011 年 4 月北京通州	JQ319074	H16
C. auratus auratus	BJX03	N/A	2011 年 4 月北京通州	JQ319075	H16
C. auratus auratus	BJX04	N/A	2011 年 4 月北京通州	JQ319076	H16
C. auratus auratus	BJX05	N/A	2011 年 4 月北京通州	JQ319077	H16
C. auratus auratus	BJX06	N/A	2011 年 4 月北京通州	JQ319078	H16
C. auratus auratus	QH01	3n	2009 年 4 月河南安阳	JQ319103	H16
C. auratus auratus	QH08	3n	2009 年 4 月河南安阳	JQ319104	H16
C. auratus auratus	QH09	3n	2009 年 4 月河南安阳	JQ319105	H16
C. auratus auratus	QH11	3n	2009 年 4 月河南安阳	JQ319106	H16
C. auratus auratus	QH15	3n	2009 年 4 月河南安阳	JQ319107	H16

续表

学名 Scientific name	标本 Specimen	倍性 Ploidy level	采集时间地点 Sampling time & locality	GenBank 登录号 GenBank Accession No.	单倍型 Haplotypes
C. auratus auratus	KM01	N/A	2010 年 12 月云南昆明	JQ319100	H16
C. auratus auratus	KM02	N/A	2010 年 12 月云南昆明	JQ319101	H16
C. auratus auratus	KM03	N/A	2010 年 12 月云南昆明	JQ319102	H16
C. carassius	IFCZE084-10	N/A	N/A	HQ960498	H1
C. carassius	IFCZE314-10	N/A	N/A	HQ960715	H2
C. carassius	IFCZE315-10	N/A	N/A	HQ960716	H2
C. carassius	IFCZE316-10	N/A	N/A	HQ960717	H2
C. carassius	IFCZE317-10	N/A	N/A	HQ960718	H2
C. carassius	IFCZE318-10	N/A	N/A	HQ960719	H2
C. carassius	IFCZE644-10	N/A	N/A	HQ961037	H2
C. carassius	IFCZE646-10	N/A	N/A	HQ961038	H2
C. carassius	IFCZE647-10	N/A	N/A	HQ961039	H2
C. carassius	IFCZE648-10	N/A	N/A	HQ961040	H2
C. carassius	IFCZE764-11	N/A	N/A	N/A	H3
C. carassius	IFCZE765-11	N/A	N/A	N/A	H3
C. carassius	IFCZE766-11	N/A	N/A	N/A	H3
C. carassius	IFCZE750-11	N/A	N/A	N/A	H4
C. carassius	IFCZE548-10	N/A	N/A	HQ960942	H5
C. carassius	IFCZE200-10	N/A	N/A	HQ960610	H6
C. carassius	IFCZE742-11	N/A	N/A	N/A	H6
C. cuvieri	GBGC5894-08	N/A	N/A	NC_010768	H7
C. cuvieri	N/A	N/A	N/A	AB045144	H7
C. cuvieri	N/A	N/A	N/A	HQ536316	H7
C. cuvieri	N/A	N/A	N/A	HQ536317	H7
C. cuvieri	N/A	N/A	N/A	HQ536318	H7
C. cuvieri	N/A	N/A	N/A	HQ536319	H7
C. gibelio	IFCZE237-10	N/A	N/A	HQ960643	H8
C. gibelio	IFCZE238-10	N/A	N/A	HQ960644	H8
C. gibelio	IFCZE489-10	N/A	N/A	HQ960884	H8
C. gibelio	GRFRF001-08	N/A	N/A	HQ600703	H9
C. gibelio	IFCZE206-10	N/A	N/A	HQ960616	H9
C. gibelio	IFCZE490-10	N/A	N/A	HQ960885	H9
C. auratus	GBGC7783-09	N/A	N/A	EU266381	H10
C. gibelio	GRFRF002-08	N/A	N/A	HQ600702	H10
C. gibelio	GRFRF003-08	N/A	N/A	HQ600701	H10
C. gibelio	GRFRF051-08	N/A	N/A	HQ600706	H10
C. gibelio	GRFRF053-08	N/A	N/A	HQ600704	H10
C. gibelio	IFCZE085-10	N/A	N/A	HQ960499	H10
C. gibelio	IFCZE144-10	N/A	N/A	HQ960556	H10
C. gibelio	IFCZE207-10	N/A	N/A	HQ960617	H10
C. gibelio	IFCZE236-10	N/A	N/A	HQ960642	H10
C. gibelio	IFCZE334-10	N/A	N/A	HQ960734	H10
C. gibelio	IFCZE335-10	N/A	N/A	HQ960735	H10
C. gibelio	IFCZE336-10	N/A	N/A	HQ960736	H10

续表

学名 Scientific name	标本 Specimen	倍性 Ploidy level	采集时间地点 Sampling time & locality	GenBank 登录号 GenBank Accession No.	单倍型 Haplotypes
C. gibelio	IFCZE337-10	N/A	N/A	HQ960737	H10
C. gibelio	IFCZE456-10	N/A	N/A	HQ960853	H10
C. gibelio	IFCZE457-10	N/A	N/A	HQ960854	H10
C. gibelio	IFCZE458-10	N/A	N/A	HQ960855	H10
C. gibelio	IFCZE488-10	N/A	N/A	HQ960883	H10
C. gibelio	IFCZE570-10	N/A	N/A	HQ960963	H10
C. gibelio	IFCZE571-10	N/A	N/A	HQ960964	H10
C. gibelio	IFCZE642-10	N/A	N/A	HQ961035	H10
C. gibelio	IFCZE643-10	N/A	N/A	HQ961036	H10
C. gibelio	IFCZE698-10	N/A	N/A	HQ961090	H10
C. gibelio	IFCZE844-11	N/A	N/A	N/A	H10
C. gibelio	IFCZE841-11	N/A	N/A	N/A	H11
C. gibelio	GRFRF052-08	N/A	N/A	HQ600705	H12
C. gibelio	GRFRF110-08	N/A	N/A	HQ600699	H12
C. gibelio	GRFRF111-08	N/A	N/A	HQ600698	H12
C. gibelio	GRFRF112-08	N/A	N/A	HQ600697	H12
C. gibelio	GRFRF179-10	N/A	N/A	HQ600700	H12
C. auratus	BCFB735-06	N/A	N/A	EU524450.1	H13
C. auratus	BCFB736-06	N/A	N/A	EU524449.1	H13
C. auratus	BCFB737-06	N/A	N/A	EU524448.1	H13
C. auratus	FOAD213-05	N/A	N/A	EF609306	H13
C. auratus	GBGC0066-06	N/A	N/A	AB111951	H13
C. auratus	GBGC1725-06	N/A	N/A	NC_006580	H13
C. auratus	GBGC6460-09	2n	N/A	AB379921	H13
C. auratus	GBGC6461-09	2n	N/A	AB379920	H13
C. auratus	GBGC6462-09	2n	N/A	AB379919	H13
C. auratus	GBGC6463-09	2n	N/A	AB379918	H13
C. auratus	GBGC6464-09	2n	N/A	AB379917	H13
C. auratus	GBGC6465-09	2n	N/A	AB379916	H13
C. auratus	GBGC6466-09	2n	N/A	AB379915	H13
C. auratus	ACLB017-06	N/A	N/A	HM102292	H13
C. carassius	GBGC1701-06	N/A	N/A	NC_006291	H13
C. gibelio	IFCZE170-10	N/A	N/A	HQ960582	H13
C. gibelio	IFCZE171-10	N/A	N/A	HQ960583	H13
C. gibelio	IFCZE572-10	N/A	N/A	HQ960965	H13
C. auratus	GBGC6459-09	N/A	N/A	AB379922	H16
C. auratus	GBGC1505-06	N/A	N/A	NC_002079	H17
C. langsdorfii	IFCZE726-11	N/A	N/A	N/A	H18
C. langsdorfii	IFCZE827-11	N/A	N/A	N/A	H18
C. langsdorfii	IFCZE831-11	N/A	N/A	N/A	H18
C. auratus langsdorfii	N/A	N/A	N/A	AB006953	H18

AB379915~AB379921 序列来自于金鱼，为 Komiyama et al (2009)递交，据此推测倍性应该是 2n，但未在本研究中检测；公共数据库中下载序列的学名为递交者命名，本文采集样品按照 Chen & Huang (1982)标准分类，公共数据库中的 *C. gibelio* 与 *C. auratus gibelio* 应是同物异名。

AB379915-AB379921 sequences which were submitted by Komiyama et al (2009) were inferred to be from 2n specimens, because they originated from goldfish. However, their ploidy levels were not directedly tested in this study; scientific name of sequences downloaded from public databases were named by submitter; the specimens collected in this study were classified in accordance with criteria of Chen & Huang (1982). In public database, *C. gibelio* and *C. auratus gibelio are* synonyms of gibel carp.

和 *C. auratus langsdorfii* (GenBank 登录号：AB006953)共计 6 条 *COI* 基因序列也被包括在本研究中(截至 2011 年 12 月 21 日)。

1.2 *COI* 基因部分序列扩增及测序

用传统的蛋白酶 K 消化, 酚-氯仿抽提法从鲫鱼鳍条组织中分离、纯化总 DNA。依据鲫鱼线粒体 DNA 序列(GenBank 登录号：AB379922)设计 PCR 扩增的正向引物 *CaCOI*-F (5'-ACCCACCGCCTAAACACTCG-3')和反向引物 *CaCOI*-R (5'-ACTTCTGGGTGACCAAAGAATCA-3')。PCR 反应体系体积 30 μL, 含 30 ng 总 DNA, 1×PCR 缓冲液, 200 μmol/L dNTPs, 引物终浓度各 0.3 μmol/L, 1 U Taq 酶。PCR 反应条件为: 94 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 30 s, 50 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 扩增 40 个循环; 最后 72 ℃终延伸 10 min。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 送生工生物工程(上海)有限公司用正向引物 *CaCOI*-F 测序。

1.3 序列分析

测序得到的 Trace 文件使用 Finch TV v.1.31 (Geospiza, Inc.)软件查看, 转换成 fasta 格式文件供进一步分析用。测序结果编辑后用 NCBI 网站提供的 Barcode Submission Tool 递交到 Genbank 数据库中(GenBank 登录号：JQ319070-JQ319115)。所有序列用 UGENE v.1.95(Unipro, Inc.)软件中的 MUSCLE 软件包(Edgar, 2004)比对。部分公共数据库中的序列, 由于递交者扩增和编辑的方法不同, 在两端有一定的缺失, 这部分差异在使用 DNAsp v.5(Librado and Rozas 2009)统计单倍型时不计入。使用 DNAsp v.5(Librado and Rozas 2009)计算变异位点, 简约信息位点数。使用 MEGA5(Tamura et al, 2011)计算所得单倍型的碱基组成、单倍型间的转换颠换频率比值和基于 Kimura 双参数模型(Kimura 2-parameter, K2P)下各个类群内部的遗传距离及各个类群之间的平均遗传距离, 并用 MEGA5(Tamura et al, 2011)软件中的邻接法(Neighbor-Joining)构建基于 K2P 模型的单倍型进化树, 可靠性经过 1 000 次自展(Bootstrap)检验。研究中选用鲤(*Cyprinus carpio*) *COI* 基因相应片段(GenBank 登录号：JN673560)作为系统进化分析的外类群。

2 结 果

2.1 鲫鱼 *COI* 基因的序列变异

所测序列截取对应于小鼠(*Mus musculus*)*COI* 基因(NC_005089)CDS 区第 52~702 碱基之间的 651 bp 序列。下载序列多数都完整地含有这段序列, 余下少量不完整的序列其长度也在 600 bp 以上。此外, 公共数据库中有两条序列(GenBank 登录号：HQ960610 和 EF609306)各有一个错误的碱基出现, 这两个位点被作为缺失数据处理。BOLD 记录号：IFCZE750-11 序列内部有三碱基的缺失, 这些缺失并不是一个三联体, 理论上会导致 610~621 碱基间的移码突变。查找单倍型时将这些插入缺失(indel)变异排除在外, 共计得到 18 个单倍型, 这些单倍型在各个种和亚种中的分布见表 2。其中单倍型 H1(BOLD 记录号：IFCZE084-10, 无 GenBank 登录号)与其他单倍型的差异十分明显, 经 Blastn 比对发现该序列可能来源于雅罗鱼属(*Leuciscus*), 而不是

表 2 *COI* 基因单倍型在鲫属种或亚种中的分布
Tab. 2 Distribution of *COI* gene haplotypes in different species or subspecies of genus *Carassius*

单倍型 Haplotype	黑鲫 *C. carassius*	白鲫 *C. cuvieri*	鲫/金鱼 *C. auratus auratus*	银鲫 *C. auratus gibelio*	关东鲫 *C. auratus langsdorfii*
H1	1*				
H2	13				
H3	3				
H4	1				
H5	1				
H6	2				
H7		6			
H8				10	
H9				3	
H10			1	36	
H11				1	
H12				5	
H13	1#		14	3	
H14			2		
H15			1		
H16			18	1	
H17					1
H18					4

* BOLD 标本号 IFCZE084-10 的条码序列应来自雅罗鱼属(*Leuciscus*), 而不是鲫属(*Carassius*); #虽然 Genbank 登录号 NC_006291 序列标明为来源于 *C. carassius,* 但是文献中注明是来源于红鲫鱼(*C. auratus* red var.)(Guo et al, 2007)。

*BOLD specimen record IFCZE084-10 with barcode sequence maybe originated from genus *Leuciscus*, rather than genus *Carassius*; # Genbank accession No NC_006291 sequence was annotated to be origined from *C. carassius* in GenBank, but the origin paper indicated it was from the red crucian carp (Guo et al, 2007).

鲫属(*Carassius*)。余下的 17 个鲫属鱼类的单倍型 A、T、C 和 G 碱基的平均含量为 26.1%、29.0%、28.0%和 16.9%, A+T 的含量为 55.1%, 明显高于 G+C 的含量 44.9%。17 个单倍型共在 78 位点发生了碱基替换(substitution), 包括 45 个转换(transition)和 8 个颠换(transversion), 有 4 个位点同时存在转换与颠换, 简约信息位点 57 个。17 个单倍型总的平均转换颠换比(Ti/TV, R)为 7.32。*C. auratus langsdorfii* 有两个独享的单倍型(H17, H18), 它与 *C. auratus auratus*、*C.auratus gibelio* 等没有共享的单倍型, 而 *C. auratus auratus* 和 *C.auratus gibelio* 有部分单倍型是共享的(H10、 H13 和 H16)。各个类群内和类群间的平均 K2P 遗传距离见表 3。

2.2　基于 *COI* 基因的鲫鱼系统树

基于 K2P 遗传距离构建的 *COI* 基因单倍型的 NJ 树见图 1。经 Blast 比对发现的可能来源于雅罗鱼属的序列(BOLD 记录号：IFCZE084-10, 无 Genbank 登录号)与其余鲫鱼单倍型的差异甚至超越了鲤属与鲫属间的差异。值得注意的是另一条序列(GenBank 登录号：NC_006291)虽然也标明为来源于 *C. carassius,* 但是却与 *C. auratus* 共享单倍型(H13)。该序列原始文献中注明是来源于红鲫鱼(*C. auratus* red var.)(Guo et al, 2007), 笔者认为这可能是由于作者在将序列递交至 GenBank 过程中对红鲫鱼学名使用错误造成的。除了这两条可能存在人为错误的序列外, 余下鲫鱼属的单倍型在 NJ 树中形成了 5 个主要的分支, 分别对应 *C. carassius*、*C. Cuvieri*、 *C. auratus langsdorfii*、 *C. auratus gibelio* 和 *C. auratus auratus*(图 2)。NJ 树显示 *C. auratus gibelio* 和 *C. auratus auratus* 关系较近, 这两个亚种

表 3　鲫属各类群间平均遗传距离和各个类群内平均遗传距离

Tab. 3　Mean genetic distance between and within each group in genus *Carassius*

类群 Group	类群间平均遗传距离 Between group mean distance				类群内平均遗传距离 Within group mean distance
	C. carassius	*C. cuvieri*	*C. auratus gibelio*	*C. auratus auratus*	
C. carassius					0.007
C. cuvieri	0.071				N/A
C. auratus gibelio	0.066	0.054			0.003
C. auratus auratus	0.063	0.056	0.007		0.004
C. auratus langsdorfii	0.075	0.058	0.038	0.037	0.009

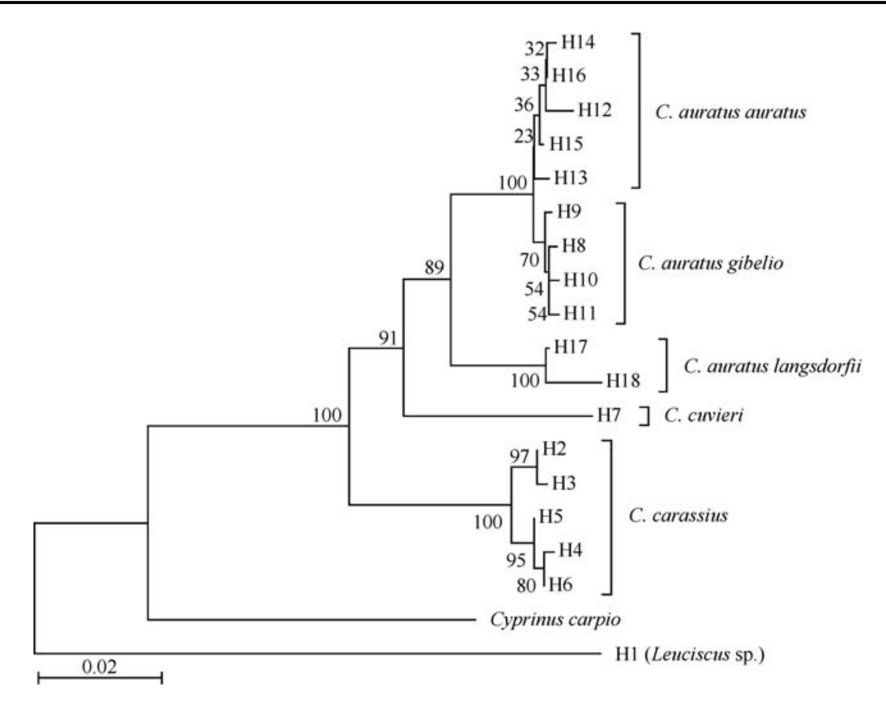


图 1　基于 K2P 遗传距离构建的 *COI* 基因单倍型 NJ 树

Fig. 1　Neighbor-joining tree of *COI* gene haplotypes based on Kimura 2-parameter (K2P)

分布于欧亚大陆，随后这两个亚种与分布于日本列岛的 *C. auratus langsdorfii* 聚为一支，NJ 树拓扑结构大体与鲫(*C. auratus*)各个亚种的地缘关系一致。NJ 树中白鲫 *C. cuvieri* 和 *C. auratus* 关系更为紧密，早期有鱼类分类学者认为鲫属只有两个物种 *C. carassius* 和 *C. auratus*，而 *C. cuvieri* 是 *C. auratus* 的一个亚种。

3 讨 论

3.1 鲫属鱼类的物种有效性

本文从公共数据库中下载得到的 6 条 *C. cuvieri* 序列为同一单倍型(H7)，与其他鲫属鱼类单倍型有显著差异。除了上述可能存在错误的两条标为 *C. carassius* 的序列外，本研究测定的及从公共数据库中下载的 *C. carassius* 序列聚为一个得到高自展值支持的单系群。这些结果支持应将 *C. cuvieri* 与 *C. carassius* 视为两个独立于 *C. auratus* 之外的有效物种。近年来越来越多的学者习惯将 *C. auratus gibelio* 也视为一个有效种，一些国外研究报告(Tsoumani et al, 2006; Flajšhans et al, 2008; Leonardos et al, 2008; Liousia et al, 2008)及著名的 Fishbase、NCBI 等网站均接受了这一分类系统，BOLD 系统中也多将银鲫记为 *C. gibelio*(表 1)。传统形态分类一直认为中国鲫鱼可以分为 *C. auratus auratus* 与 *C. auratus gibelio* 两个亚种，两者的分布区域大体上以长城为界(Chen & Huang, 1982; Ren et al, 2002; Shen et al, 1997)。本研究中我们发现 *C. auratus auratus* 与 *C. auratus gibelio* 的 *COI* 单倍型的也形成两个有较明显分化的分支(图 1)，但是两类群的遗传距离小于 0.01，并且 *C. auratus auratus* 与 *C. auratus gibelio* 有相当一部分单倍型是共享的(表 2)。它们彼此间的亲缘关系比各自与另外一个来自日本的亚种(*C. auratus langsdorfii*)更近。因此，本研究基于 DNA 条形码的证据支持将银鲫(*C. auratus gibelio*)视为鲫(*C. auratus*)的一个亚种，而不是一个独立的有效种。

综上所述，本研究结果支持将鲫属鱼类分为 3 个物种。黑鲫(*C. carassius*)分布于中亚及欧洲，也被称为欧鲫，我国仅见于新疆额尔斯河流域(Chen & Huang, 1982; Ren et al, 2002; Shen et al, 1997)，其背鳍外缘呈凸弧形，末根硬刺较弱，而白鲫(*C. cuveri*)和鲫(*C. auratus*)背鳍外缘平直或微内凹，末根硬刺强。多数文献记载黑鲫(*C. carassius*)鳃耙数在 25~31 之间(Chen & Huang, 1982; Ren et al, 2002)，但《中国动物志·硬骨鱼纲·鲤形目·下卷》中记载其鳃耙数为 30~52(Luo & Yue, 2000)。这可能是排版疏忽造成的，因为该书的前期工作总结形成的《中国鲤科鱼类志》中记载其鳃耙数为 27~29(Chen & Huang, 1982)。白鲫 (*C. cuveri*)分布范围较窄只限于日本列岛的部分水域，该种鳃耙密而细长，数目为 92~130，据此特征可以与鲫属其他种或亚种区分(Hosoya, 2002)。鲫(*C. auratus*)在东亚有广泛的地理分布(Chen & Huang, 1982; Hosoya, 2002; Ren et al, 2002; Shen et al, 1997)，近年来更入侵到中亚和欧洲的部分水体中(Jakovlić & Gui, 2011; Kalous et al, 2007; Tsoumani et al, 2006; Wheeler, 2000)，其生物学特性复杂，分类也最不完善。

3.2 鲫亚种的划分

东亚的鲫(*C. auratus*)可以分为分化明显的两支，一支分布于日本列岛；另一支分布于欧亚大陆(Takadab et al, 2010)。本研究中，日本的 *C. auratus langsdorfii* 与欧亚大陆的 *C. auratus* 样本也明显地分为两支。利用 *COI* 序列有效地进行物种鉴别的基础是该基因种间的遗传变异显著大于种内的遗传变异(Hebert et al, 2003a)。不同生物类群该基因的保守性会有很大的差异，具体的物种分化阈值应该结合该类群自身的特性决定；但是大量研究表明，物种内的 *COI* 基因的序列分歧很少有大于 2%的，大部分的种内分歧小于 1% (Hebert et al, 2003b)。本研究中日本的 *C. auratus langsdorfii* 自成一系，与欧亚大陆的其他 *C. auratus* 样品聚成的支系间的遗传距离大于 0.03，而各自内部的遗传距离均小于 0.01，显示日本列岛的 *C. auratus langsdorfii* 与欧亚大陆的其他 *C. auratus* 样品的属于两个不同的线粒体谱系。而且，日本列岛分布的鲫 *C. auratus* 至少部分亚种在表型上与欧亚大陆的鲫 *C. auratus* 有显著差异，如 *C. auratus* subsp 1. 背鳍软鳍条 11~14，*C. auratus grandaculis* 鳃耙 51~73(Hayosa, 2002)。当然是否应该将日本列岛的鲫与欧亚大陆的鲫视作两个有效物种还需要形态、解剖、生理、 生态等多方面的证据。

我国分布的鲫 *C. auratus* 其背鳍软鳍条数 15~19，鳃耙数 37~54，可以分为两个亚种。*C. auratus auratus* 在我国各个主要水系均有分布，脊椎骨数 4+26~28，侧线鳞 27~30，而 *C. auratus gibelio* 脊椎骨数 4+28~30，侧线鳞 29~32。*C. auratus*

gibelio 在我国主要分布于黑龙江和额尔齐斯河水系，国外则自欧洲多瑙河至俄罗斯远东地区、朝鲜半岛皆有分布，但是欧洲是否是其自然分布区则有争议(Chen & Huang, 1982; Luo & Yue, 2000; Ren et al, 2002)。本文及前人的研究均发现我国的鲫也存在两支分化比较明显的线粒体谱系：一支分布于中国的北方和俄罗斯，为银鲫(*C. auratus gibelio*)；另一支主要分布于中国的南方(Li & Gui, 2008; Takada et al, 2010)，为鲫指名亚种(*C. auratus auratus*)。

金鱼可能起源于中国的银鲫(Komiyama et al, 2009)，但是随后有学者证明金鱼并非起源于银鲫而是起源于中国鲫鱼的另一个谱系(Rylková et al, 2010)。本研究也包括了金鱼(H13: AB379915~AB379921)(Komiyama et al, 2009)，红鲫(H13, NC_006291)(Guo et al, 2007)和彩鲫(H14:JQ319079, JQ319081; H15: JQ319080)等样品，它们的 *COI* 基因单倍型与鲫指名亚种(*C. auratus auratus*)的相同或相近，而与银鲫(*C. auratus gibelio*)的关系稍远。分子证据支持金鱼起源于中国南方的鲫(*C. auratus auratus*)而不是银鲫(*C. auratus gibelio*)，这也与历史记载相符。自 20 世纪 80 年代以来中国学者陆续在全国多个地方发现了鲫三倍体种群(Gui, 2007; Gui & Zhou 2010)，有学者在研究中习惯将三倍体等同于银鲫(Gui, 2007; Shen et al, 1997)。近年来日本学者也习惯将日本分布的多倍体鲫归为关东鲫(*C. auratus langsdorfii*)(Hosoya, 2002; Ohara et al, 1999, 2000)，但是越来越多的研究发现三倍体鲫在线粒体谱系上更加接近于同域的二倍体(Apalikova et al, 2008; Brykov et al, 2002; Murakami et al, 2001; Takada et al, 2010)。本研究也发现某些单倍型是二倍体与三倍体共享的(表 1)，*C. auratus auratus*，和 *C. auratus gibelio* 中都同时有二倍体和三倍体。因此，倍性也不宜作为种的划分标准，简单的将三倍体视为独立的种或者亚种并不恰当。

致谢：中国水产科学研究院黑龙江水产研究所任慕莲研究员采集了新疆的黑鲫(*C. carassius*)，中国科学院昆明动物研究所陈兵博士采集了昆明的鲫(*C. auratus*)样品，特此致谢！

参考文献：

Apalikova OV, Eliseikina MG, Kovalev MY, Brykov VA. 2008. Collation of data on the ploidy levels and mitochondrial DNA phylogenetic lineages in the silver crucian carp *Carassius auratus gibelio* from Far Eastern and Central Asian populations [J]. *Russ J Gene,* **44**(7): 873-880.

Brykov VA, Polyakova NE, Skurikhina LA, Dolganov SM, Eliseikina MG, Kovalev MY. 2002. Mitochondrial DNA variation in goldfish *Carassius auratus gibelio* from far eastern water reservoirs [J]. *Russ J Gene,* **38**(10): 1176-1180.

Chen XL, Huang HJ. 1982. Cyprininae [M] // Wu XW. Monographs of Cyprinidae in China. Shanghai: Shanghai People's Press. [陈湘粦，黄宏金. 1982. 鲤亚科[M]// 伍献文. 中国鲤科鱼类志. 上海：上海科学技术出版社, 395-438.]

Chen Z. 1959. The Domestification and Variation of Goldfish [M]. Beijing: Science Press. [陈帧. 1959. 金鱼的家化与变异[M]. 北京：科学出版社.]

Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput [J]. *Nucleic Acids Res,* **32**(5): 1792-1797.

Fan ZT, Shen JB. 1990. Studies on the evolution of bisexual reproduction in crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) [J]. *Aquaculture,* **84**(3-4): 235-244.

Flajšhans M, Rodina M, Halačka K, Vetešník L, Gela D, Lusková V, Lusk S. 2008. Characteristics of sperm of polyploid Prussian carp *Carassius gibelio* [J]. *J Fish Biol,* **73**(1): 323-328.

Geng B, Sun XW. 2008. The application of Flow cytometry on the DNA content and ploidy analysis of hydrophily organisms [J]. *Chn J Fish,* **21**(2): 21-24. [耿波，孙效文. 2008. 流式细胞术在水生生物 DNA 含量和倍性分析中的应用 [J]. 水产学杂志, **21**(2): 21-24.]

Gui JF. 2007. Partialarity and genetic basis of reproduction mode of gibel carp [M] // Gui JF. Genetic Basis and Artificial Control of Sexuality and Reproduction in Fish. Beijing: Science Press, 107-124. [桂建芳. 2007. 银鲫生殖方式的特殊性及其遗传基础 [M]// 桂建芳. 鱼类性别和生殖的遗传基础及其人工控制. 北京：科学出版社, 107-124.]

Gui JF, Zhou L. 2010. Genetic basis and breeding application of clonal diversity and dual reproduction modes in polyploid *Carassius auratus gibelio* [J]. *Sci Chn Life Sci,* **53**(4): 409-415.

Guo XH, Liu SJ, Liu Y. 2007. Evidence for maternal inheritance of mitochondrial DNA in allotetraploid [J]. *DNA Seq,* **18**(4): 247-256.

Halacka K, Luskova V, Lusk S. 2003. *Carassius "gibelio"* in fish communities of the Czech Republic [J]. *Ecohydrol Hydrobiol,* **3**(1): 133-138.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Roy Soc Lond B Biol,* **270**(1512): 313-321.

Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR. 2003b. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. *Proc Roy Soc Lond B Bio,* **270**(Suppl 1): S96-S99.

Hosoya K. 2002. Cyprinidae [M] // Nakabo T. Fishes of Japan with Pictorial Keys to the Species. English edn. Tokyo: Tokai University Press, 253-254.

Jakovlić I, Gui JF. 2011. Recent invasion and low level of divergence between diploid and triploid forms of *Carassius auratus* complex in Croatia [J]. *Genetica,* **139**(6): 789-804

Kalous L, Šlechtová V Jr, Bohlen J, Petrtýl M, Švátora M. 2007. First European record of *Carassius langsdorfii* from the Elbe basin [J]. *J Fish Biol,* **70**(Suppl): 132-138.

Kobayasi H. 1971. A cytological study on gynogenesis of the triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfii*) [J]. *Zool Mag,* **80**: 316-322.

Kobayasi H, Kawashima Y, Takeuchi N. 1970. Comparative chromosome

studies in the genus Carassius, especially with a finding of polyploidy in the ginbuna (*C. auratus langsdorfii*)[J]. *Jpn J Ichthyol,* **17**(4): 153-160.

Komiyama T, Kobayashi H, Tateno Y, Inoko H, Gojobori T, Ikeo K. 2009. An evolutionary origin and selection process of goldfish [J]. *Gene,* **430**(1-2): 5-11.

Leonardos ID, Tsikliras AC, Eleftheriou V, Cladas Y, Kagalou I, Chortatou R, Papigioti O. 2008. Life history characteristics of an invasive cyprinid fish (*Carassius gibelio*) in Chimaditis Lake (northern Greece) [J]. *J Appl Ichthyol,* **24**(2): 213-217.

Li FB, Gui JF. 2008. Clonal diversity and genealogical relationships of gibel carp in four hatcheries [J]. *Anim Genet,* **39**(1): 28-33.

Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. *Bioinformatics,* **25**(11): 1451-1452.

Liousia V, Liasko R, Koutrakis E, Leonardos ID. 2008. Variation in clones of the sperm-dependent parthenogenetic *Carassius gibelio* (Bloch) in Lake Pamvotis (north-west Greece)[J]. *J Fish Biol,* **72**(1): 310-314.

Luo YL, Yue PQ. 2000 Cyprininae [M] // Yue PQ. Fauna Sinica, Osteichthyes, Cypriniformes Ⅲ. Beijing: Science Press, 427-434. [罗云林, 乐佩琦. 2000. 鲤亚科[M]// 乐佩琦. 中国动物志(硬骨鱼纲·鲤形目·下卷). 北京: 科学技术出版社, 427-434.]

Murakami M, Matsuba C, Fujitani H. 2001. The maternal origins of the triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfi*): phylogenetic relationships within the *C. auratus* taxa by partial mitochondrial D-loop sequencing [J]. *Genes Genet Syst,* **76**(1): 25-32.

Öezuluğ M, Meriç N, Freyhof J. 2004. The distribution of *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) (Teleostei: Cyprinidae) in Thrace (Turkey) [J]. *Zool Middle East,* **31**: 63-66.

Ohara K, Ariyoshi T, Sumida E, Sitizyo K, Taniguchi N. 2000. Natural hybridization between diploid crucian carp species and genetic independence of triploid crucian carp elucidated by DNA markers [J]. *Zool Sci,* **17**(3): 357-364.

Ohara K, Dong S, Taniguchi N. 1999. High proportion of heterozygotes in microsatellite DNA loci of wild clonal silver crucian carp, *Carassius langsdorfii* [J]. *Zool Sci,* **16**(6): 909-913.

Ren ML, Guo Y, Zhang RM, Cai LG, Li H, Adak, Fu YL, Liu KL, Zhang XS, Deng GZ. 2002. Fisheries Resources and Fishery of the Ertixhe River in China [M]. Urumqi: Xinjiang Science, Technology and Health Press, 145-162. [任慕莲, 郭焱, 张人铭, 张秀善, 蔡林钢, 李红, 阿达克, 付亚丽, 刘昆仑, 郑贵中. 2002. 中国额尔齐斯河鱼类资源及渔业[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 145-162.]

Rylková K, Kalous L, Slechtová V, Bohlen J. 2010. Many branches, one root: first evidence for a monophyly of the morphologically highly diverse goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture,* **302**(1-2): 36-41.

Shen JB, Liu MH, Fan ZT. 1997. Silver Crucian Carp in Amur River [M]. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Press. [沈俊宝, 刘明华, 范兆廷. 1997. 黑龙江银鲫 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社.]

Takada M, Tachihara K, Kon T, Yamamoto G, Iguchi K, Miya M, Nishida M. 2010. Biogeography and evolution of the *Carassius auratus*-complex in East Asia [J]. *BMC Evol Biol,* **10**(1): 7.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol,* **28**(10): 2731-2739.

Tsoumani M, Liasko R, Moutsaki P, Kagalou I, Leonardos I. 2006. Length-weight relationships of an invasive cyprinid fish (*Carassius gibelio*) from 12 Greek lakes in relation to their trophic states [J]. *J Appl Ichthyol,* **22**(4): 281-284.

Wang CY. 2007. Variation and Heredity of Goldfish [M]. Beijing: China Agriculture Press. [王春元. 2007. 金鱼的变异与遗传[M]. 北京: 中国农业出版社.]

Ward RD, Hanner R, Hebert PDN. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL [J]. *J Fish Biol,* **74**(2): 329-356.

Ward RD, Costa FO, Holmes BH, Steinke D. 2008. DNA barcoding of shared fish species from the North Atlantic and Australasia: minimal divergence for most taxa, but *Zeus faber* and *Lepidopus caudatus* each probably constitute two species [J]. *Aquat Biol,* **3**(1): 71-78.

Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. 2005. DNA barcoding Australia's fish species [J]. *Philos Trans R Soc B,* **360**(1462): 1847-1857.

Wheeler A. 2000. Status of the crucian carp, *Carassius carassius* (L.), in the UK [J]. *Fisheries Manag Ecol,* **7**(4): 315-322.

Xiao J, Zou T M, Chen Y B, Chen L, Liu S J, Tao M, Zhang C, Zhao R R, Zhou Y, Long Y, You C P, Yan J P, Liu Y. 2011. Coexistence of diploid, triploid and tetraploid crucian carp (*Carassius auratus*) in natural waters [J]. *BMC Genet,* **12**: e20.

Yamamoto G, Takada M, Iguchi K, Nishida M. 2010. Genetic constitution and phylogenetic relationships of Japanese crucian carps (*Carassius*) [J]. *Ichthyol Res,* **57**(3): 215-222.